第14卷 第4期 昆虫学报 Vol. 14, No.4
1965年7月 ACTA ENTOMOLOGICA SINICA July, 1965

选择性有机磷杀虫剂的研究 阿赛硫磷(Acethion)类化合物的化学結构和生物活性*

刘 珣 冷欣夫 楊畔農
(中国科学院动物研究所)

摘要 本文研究了一系列阿赛硫磷(Acethion)类化合物对家蝇头部胆碱酯酶的抑制作用、豉鼠肝羧酸酯酶的水解作用以及对家蝇(*Musca domestica vicina* Macq.)和小白鼠的毒性。化合物的羧酸酯酶水解速度(CO_2微升)的对数值和抗胆碱酯酶活性的负对数(pI_{50})与烷基誘导效应指数(I)之间都存在直线关系。化合物对家蝇毒性(LD_{50})的对数值与抗胆碱酯酶活性的负对数(pI_{50})之间大致有直线关系,但有些化合物距离直线较远,这可能由于在体内易于进行活化作用使毒性增高。化合物对小白鼠毒性(LD_{50})的对数值与羧酸酯酶水解速度(CO_2微升)对数值之间,没有直线关系。说明羧酸酯酶的水解作用不是此类化合物解毒作用的唯一因素,可能包括磷酸酶的水解作用。所合成的化合物大部分都有选择毒性,其中AP_4的选择比率(LD_{50}小白鼠/LD_{50}家蝇)最高,为221。

一、前 言

有机磷杀虫剂具有优越的效能,但有对温血动物毒性过高的缺点。近年来出现多种高效低毒的有机磷杀虫剂,其中马拉硫磷(O,O-二甲基 S-(1,2-双乙酯基)乙基二硫磷酸酯)是性能优越而研究最多的一个。March(1956)曾指出马拉硫磷的高度选择毒性是由于在昆虫体內缺乏有效的代谢作用所致。其后 O'Brien(1957)设想马拉硫磷对哺乳动物毒性低是由于羧酸酯键在体内进行水解。这一假设被以后 Krueger 和 O'Brien(1959)的工作所证实,他们提出此一降解作用是由羧酸酯酶催化进行的。O'Brien(1958)认为羧酸酯酶既然能水解马拉硫磷,也能水解其他带有烷酯基的有机磷酸酯化合物,他们合成了阿赛硫磷(O,O-二乙基 S-乙酯甲基二硫磷酸酯),结果也有高度选择毒性。Matsumura 等(1961)在研究蚊幼虫对马拉硫磷的抗性时指出,抗性品系与正常品系之间的差别主要在于前者具有高度羧酸酯酶活性。如加入羧酸酯酶抑制剂 EPN,则可增加马拉硫磷对抗性品系的毒效。最近,Matsumura 和 Brown(1963)的工作直接证明了以上的设想,他们从马拉硫磷抗性蚊幼虫和感性蚊幼虫体內分出羧酸酯酶,它是单一的蛋白质,分子量为16000,并发现抗性品系体內羧酸酯酶的浓度为感性品系的13倍。Dauterman 等和 Matsumura 等(1962,1964)进一步研究了马拉硫磷分子中烷酯基与毒性的关系,他们测定了一系列马拉硫磷类似物对感性和抗性蚊幼虫和家蝇的毒性。结果发现家蝇的抗性专属性低于蚊幼虫,但二者有相同的趋势,对乙酯基具有最高的抗性。当乙酯基被甲酯基取代后,蚊幼虫的抗性完全消失。但是甲酯基和乙酯基都可被哺乳动物体内的羧酸酯酶

* 本工作承熊尧先生指导,谢尊逸同志提供宝贵意见,谨致谢意。
本文曾在1964年中国昆虫学会20周年学术讨论会药剂毒理组宣读。

所水解（O'Brien, 1958)。由此可以设想不同种的昆虫之间以及哺乳动物与昆虫之间的羧酸酯酶水解底物的专属性可能不同。因此改变阿赛硫磷分子中的烷酯基就有可能找出选择性更高的杀虫剂。本文将报导一系列 O,O-二烷基 S-烷酯基烷基二硫磷酸酯，通式为

$$\begin{matrix} R_1O \\ R_1O \end{matrix} \Big> P \Big< \begin{matrix} S \\ S-R_2-COOR_3 \end{matrix}$$

其中 R_1R_3 为烷基(或 R_3 为苯基)，R_2 为次甲基、次乙基或取代次甲基，X 为氧或硫，对家蝇 (*Musca domestica vicina* Macq.) 及小白鼠的毒性以及被羧酸酯酶的水解作用和对胆碱酯酶的抑制作用，从而研究化学结构、水解速度和生物活性之间的关系。

二、实验部分

1. 合成 所用的化合物是按以下两种方法合成的（刘珣等, 1964): 1）O,O-二烷基二硫磷酸铵盐和相应的氯代脂肪酸酯类在丙酮中进行缩合作用。2）O,O-二乙基二硫磷酸酯和丙烯酸甲酯进行加成作用。化合物的结构式和物理常数见表 1。

2. 鼠肝羧酸酯酶对化合物的水解作用 取小白鼠 26 只，活体解剖后共取肝组织 24 克，放入组织捣碎机内，加入丙酮和干冰使温度降至 −30℃ 左右，立即捣碎，用水泵吸滤。滤渣用同样方法再捣碎一次，过滤后在室温挥发至干，得干粉 6.4 克，贮藏于冰箱内备用。

根据 O'Brien 等(1958)的方法，将鼠肝粉用 Krebs-Ringer 磷酸盐缓冲液制成 5% 匀浆，在瓦氏呼吸器反应瓶内放入此匀浆液 2 毫升，然后加入 1.25% 碳酸氢钠溶液 0.5 毫升。瓶内通入 5% CO_2 和 95% N_2 混合气体，并放于 37℃ 恒温水浴中。从侧管加入化合物乳液 0.5 毫升(含 5% Tween-80 乳化剂)使化合物的最后浓度为 $5 \times 10^{-3}M$。经 2 分钟后开始记录 30 分钟内释放的 CO_2 体积，并以不含酶液的非酶水解试验作为对照，所得结果见表 2。

3. 化合物对家蝇头部胆碱酯酶活性的抑制作用 根据 Metcalf 等(1949)方法，取羽化后 1 天的雌性家蝇，将头部切下，用碳酸氢钠缓冲液制成匀浆。在瓦氏呼吸器反应瓶内放入相当于 3 个蝇头的匀浆液，然后加入不同浓度的化合物丙酮溶液，在 37℃ 下培育 30 分钟，从侧管加入 0.1 克分子浓度的氯化乙酰胆碱，根据 30 分钟内放出的 CO_2 体积计算抑制百分率。由不同浓度药液的抑制百分率计算出抑制中浓度 (I_{50})，并以不含化合物的空白试验作对照，所得结果见表 3。

4. 毒性测定

1）羽化 4 天的雌性家蝇成虫，经二氧化碳麻醉，用微量注射器在前胸背板处滴加化合物的丙酮溶液 1 微升。处理后，在 25—27℃ 下恢复，24 小时后检查死亡率，从剂量对数机率曲线算出 LD_{50}，结果见表 3。

2）用体重 18—25 克小白鼠(雌雄混合)作胃管注射，一次口服化合物乳液 0.5 毫升，24 小时后检查死亡率。依梯级上下测定法算出 LD_{50}，结果见表 3。

三、討 論

阿赛硫磷被鼠肝水解后，主要产物为 O,O-二乙基 S-乙酸基二硫磷酸酯，同时后者不

表 1　O,O-二烷基 S-烷酯基烷基二硫代磷酸酯

编号	结构式	沸点 (℃/毫米)	折射率 n_D^{20}	比重 d_4^{20}	磷含量 计算值	磷含量 实验值
AP_1	$(C_2H_5O)_2P(S)SCH_2COOCH_3$	99.6—100.5/0.07	1.5070	1.2158	11.99	11.93 11.94
AP_2	$(C_2H_5O)_2P(S)SCH_2COOC_2H_5$	104.5—105.5/0.08	1.5011	1.1823	11.37	11.56 11.30
AP_3	$(C_2H_5O)_2P(S)SCH_2COOC_3H_7\text{-}n$	113.5—114.5/0.07	1.4995	1.1595	10.82	10.84 10.76
AP_4	$(C_2H_5O)_2P(S)SCH_2COOC_3H_7\text{-}i$	106—107/0.07	1.4950	1.1513	10.82	10.81 10.88
AP_5	$(C_2H_5O)_2P(S)SCH_2COOC_4H_9\text{-}n$	119.5—120.5/0.01	1.4958	1.1397	10.31	10.35 10.34
AP_6	$(C_2H_5O)_2P(S)SCH_2COOC_4H_9\text{-}t$	125—126/0.04	1.4939	1.1272	10.31	10.49 10.45
AP_7	$(C_2H_5O)_2P(S)SCH_2COOC_6H_5$	36—37			9.67	9.48 9.62
AP_8	$(C_2H_5O)_2P(S)SCHClCOOCH_3$	124—125.5/0.3	1.5094	1.2373	10.58	10.55 10.71
AP_{10}	$(C_2H_5O)_2P(S)SCH(CH_3)COOCH_3$	97.5—98.5/0.07	1.5019	1.1786	11.37	11.33 11.53
AP_{11}	$(C_2H_5O)_2P(S)SCH_2CH_2COOCH_3$	111—112/0.07	1.5052	1.1924	11.37	11.39 11.30
AP_{13}	$(C_2H_5O)_2P(S)SCH_2COSC_2H_5$	134.5—135.5/0.15	1.5393	1.2081	10.74	10.48 10.71
AP_{14}	$(C_2H_5O)_2P(S)SCH_2COOC_4H_9\text{-}i$	130—131/0.15	1.4945	1.1327	10.31	10.32 10.20
AP_{15}	$(C_2H_5O)_2P(S)SCH_2COOC_4H_9\text{-}s$	110.5—111.5/0.05	1.4940	1.1315	10.31	10.43 10.33
AP_{16}	$(i\text{-}C_3H_7O)_2P(S)SCH_2COOC_2H_5$	135—136/2	1.4908	1.1280	10.31	10.52 10.60
AP_{17}	$(CH_3O)_2P(S)SCH_2COOC_2H_5$	115—116/2	1.5153	1.2469	12.68	12.46 12.65
AP_{18}	$(i\text{-}C_4H_9O)_2P(S)SCH_2COOC_2H_5$	146—148/2	1.4895	1.0926	9.43	9.50 9.48
AP_{19}	$(n\text{-}C_3H_7O)_2P(S)SCH_2COOC_2H_5$	148—150/2	1.4969	1.1367	10.31	10.27 10.45
AP_{20}	$(n\text{-}C_4H_9O)_2P(S)SCH_2COOC_2H_5$	167—169/2	1.4931	1.1009	9.43	9.18 9.24

能被鼠肝水解（O'Brien, 1958）。所以鼠肝对化合物的水解作用可视为主要是羧酸酯酶对化合物的水解作用。从表 2 看出，R_3 的变化直接影响羧酸酯酶水解速度。在 O,O-二乙基 S-烷酯基甲基二硫磷酸酯系列中，烷基加大，羧酸酯酶水解速度增快。这与烷基的电子效应有关。如以 R_3 的诱导效应指数 I（蒋明谦等，1962）对水解作用速度（以 CO_2 微升数表示）的对数作图得到一条直线（图 1），其中只有异丁基距离直线较远。

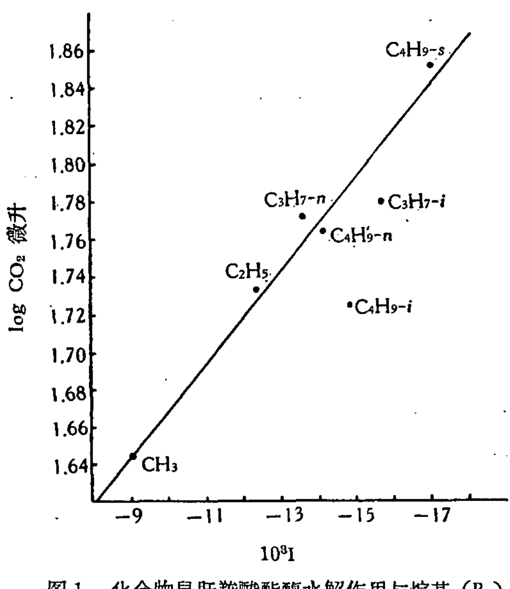
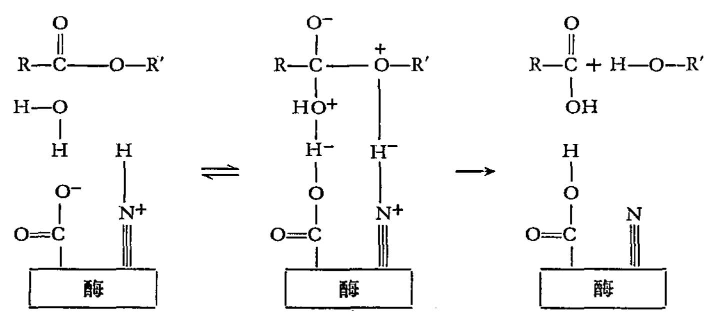


图 1 化合物鼠肝羧酸酯酶水解作用与烷基（R_3）诱导效应指数的关系

表 2 鼠肝对 O,O-二乙基 S-烷酯基烷基二硫代磷酸酯的水解作用

化合物	非酶水解（CO_2 微升）	鼠肝水解（CO_2 微升）
AP_1	6	50
AP_2	5	59
AP_3	2	61
AP_4	7	67
AP_5	4	62
AP_{10}	1	68
AP_{11}	2	136
AP_{13}	1	113
AP_{14}	1	54
AP_{15}	1	72

一般认为羧酸酯中醇烷基增大不利于酸碱催化的非酶水解作用（Ingold, 1953）。但羧酸酯酶催化的水解作用，恰好得到相反的结果。这可能由于作用机制有所不同。Barnard 和 Laidler（1952）曾提出凝乳蛋白酶催化的水解作用机制如下图示：



凝乳蛋白酶与羧酸酯酶同属于水解酶，因此可以设想羧酸酯酶催化的水解作用也具有相类似的作用机制。当 R' 基增大，也即拒电性加強，使得醇氧原子周围的电子云密度加大，容易获得质子。同时烷基拒电性加強也有利于 C=O 键的极化，电子云密度较小的碳原子更易与水分子中电子云密度较大的氧原子相结合。这样就容易形成酶-水-底物复合物，也即水解作用容易进行。异丁基（AP_{14}）具有较高的诱导效应指数，但水解速度并不高，由于异丁基的第二个碳原子上具有支键，可能立体结构不适于与酶表面相亲合，以致水解速度降低。R_2 的变化对羧酸酯的水解作用也有影响，如 AP_{10} 和 AP_{11} 中 R_2 为亚乙基（$CH_3-\underset{|}{\overset{H}{C}}-$）和次乙基（$-CH_2-CH_2-$），从表 2 看出它们的水解速度非常高，这可能由

表 3　O,O-二烷基 S-烷酯基烷基二硫代磷酸酯的毒性及抗胆碱酯酶活性

化合物	小白鼠 LD_{50}(微克/克)	家蝇 LD_{50}(微克/克)	LD_{50}(小白鼠)/LD_{50}(家蝇)	家蝇头部胆碱酯酶 pI_{50}
AP_1	1941.2	18	107.8	4.43
AP_2	700.0	13.5	51.9	5.04
AP_3	985.2	38	25.9	4.86
AP_4	992.9	4.5	220.6	5.10
AP_5	3698.7	103.5	35.7	5.08
AP_6	296.5	7.2	41.2	5.55
AP_7	1332.0	>4500	<0.3	4.08
AP_8	419.2	16.4	25.6	6.01
AP_{10}	417.9	13.1	32.0	3.33
AP_{11}	2652.4	57.6	46.1	3.99
AP_{13}	692.0	270.0	2.6	4.63
AP_{14}	4105.7	90.0	45.6	4.93
AP_{15}	—	16.2	—	4.67
AP_{16}	—	19.1	—	3.12
AP_{17}	—	135	—	4.71
AP_{18}	—	1935	—	2.77
AP_{19}	—	121.5	—	2.51
AP_{20}	—	27.0	—	5.25

于酰烷基的拒电性加強有利于 C═O 键极化，与酶易于形成复合物。AP_{13} 为硫代烷酯基，硫原子的电负性(2.5)比氧原子(3.5)为低，与酶不易形成氢键，但它的水解速度也很高，这一点还不能解释。

R_3 的变化也影响化合物的抗胆碱酯酶活性(表 3)，如以 R_3 的诱导效应指数对 pI_{50} 作图可以得到一条直线(图 2)，其中只有仲丁基 (AP_{15}) 距离较远。有机磷酸酯对胆碱酯酶进行亲电性磷酸化作用已被很多工作 (Aldridge, 1953; Aldridge & Davison, 1953; Davison, 1955) 所证实。R_3 增大，拒电性加強，促使 C═O 极化，在介质中易于形成质子化复合物

$$R-C\begin{matrix}\nearrow O\\ \searrow OR'\end{matrix} \rightleftharpoons R-\overset{+}{C}\begin{matrix}\nearrow OH\\ \searrow OR'\end{matrix}$$

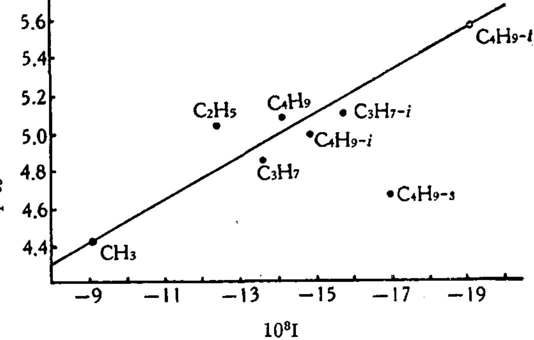


图 2　化合物抗胆碱酯酶活性与烷基 (R_3) 誘导效应指数的关系

结果使碳原子带有正电荷，它对磷原子产生负诱导效应(即吸电子)影响，使得磷原子易于进行亲电性磷酸化作用。同时 R_3 拒电性加強，在介质中不易进行酸碱催化的水解作用，因而也不易形成 COO^- 离子，有利于亲电性磷酸化作用的进行。仲丁基的诱导效应虽高，但它的抑制作用并不強。这可能由于仲丁基化合物在胆碱酯酶制剂中被其他酶系所水解，因而抑制作用不高。R_2 的变化也直接影响化合物的抗胆碱酯酶活性(表 3)。酰烷基的 α 碳上被吸电子基 Cl 取代(AP_8)，增加了磷原子的亲电性，因而抑制作用加強。反之被拒电子基 CH_3 取代 (AP_{10}) 减弱了磷原子的亲电性，因而抑制作用降低。酰烷基碳链加长如次乙基 (AP_{11}) 减弱了烷酯基对磷

原子的负诱导效应，因而抑制作用也减低。R_1 的变化对化合物的抗胆碱酯酶活性也有影响。从表 3 看出 R_1 为乙基（AP_2）时，具有较高的抗胆碱酯酶活性。其他烷基如甲基（AP_1）、正丙基（AP_{19}）、异丙基（AP_{16}）、异丁基（AP_{18}）等都低于乙基。这种现象也可用电子效应加以解释：R_1 增大，拒电性加強，不利于亲电性磷酸化作用，但可增加磷酰化酶中磷原子周围的电子云密度，以致不易被 OH^- 进攻而水解，因而有利于磷酰化酶的稳定性。磷酰化作用与磷酰化酶的稳定性对 R_1 的要求是相反的顺序，因而乙基可能是最适合的（Metcalf, 1955）。但是正丁基（AP_{20}）的抗胆碱酯酶活性较高，达到与乙基相近似的水平，这一点还无法解释。

化合物对家蝇的毒性与抗胆碱酯酶活性之间的关系不很明显。如以 LD_{50} 对数值对 pI_{50} 作图得到一些分散的点（图 3），但其中大多数的点仍可粗略地划出一条直线，个别几个点距离直线较远。AP_8 的抑制作用很強，但毒性比預期结果要低。这可能由于 AP_8 过于活泼，在体内未到达作用部位之前卽水解失效，因而毒性降低。AP_{10}、AP_{16}、AP_{19} 和 AP_{18} 的毒性都比預期结果为高，它们分子中都有一共同点卽磷原子周围烷基的拒电性比 AP_1 AP_2 中的为強。这可能促使 P═S 键在昆虫体内更易于活化，形成 P═O 键，结果使毒性增強。AP_{20} 中 R_1 为正丁基，也应有这种性质，但它的抗胆碱酯酶活性很高，与毒性数值相一致。

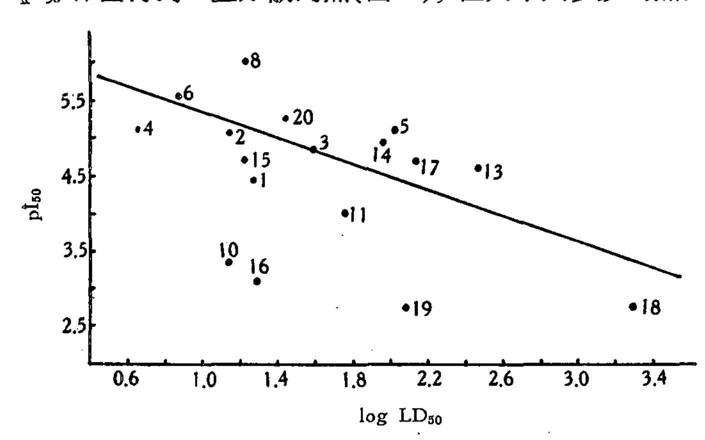


图 3 化合物对家蝇的毒性与抗胆碱酯酶活性的关系（号码表示化合物编号）

小白鼠肝脏羧酸酯酶对化合物的水解速度与化合物对小白鼠的毒性之间的关系并不一致。AP_{11} AP_{13} 的水解作用速度都很快，但毒性相差很多，前者较低，后者较高。AP_5 AP_{14} 对小白鼠的毒性都很低，但水解速度并不高。由此看出，羧酸酯酶的水解作用并不是此类化合物的唯一解毒因素，也可能包括磷酸酶和其他酶系的解毒作用。

从化合物的选择比率（LD_{50} 小白鼠/LD_{50} 家蝇）来看，大多数化合物都具有选择毒性，其中以 AP_4 最高，AP_1 次之。AP_{13} 的选择比率最低，可能由于 AP_{13} 中的硫代乙酯基易于被昆虫体内的酶系所水解，因而毒性降低。AP_7 对昆虫几乎无毒，可能由于苯基占有较大的体积，使得分子不易透过昆虫表皮。AP_7 对小白鼠的毒性也很低，由此看出芳酯基团不具有生物活性。

四、結 論

由以上的讨论可得出以下几点结论：

1. 化合物对胆碱酯酶体外抑制作用卽磷酸化作用和被羧酸酯酶的体外降解作用卽水解作用都是单一的化学反应，所以抑制強度和降解速度都与分子的化学结构密切相关。

2. 化合物对家蝇及小白鼠的毒性比较复杂，包括化合物在体内的活化和降解，化合物

本身在体内的稳定性和被抑制的酶恢复活性的速度，以及化合物对昆虫表皮的渗透作用等。因而毒性与化学结构间不易有简单明确的关系。表 3 所列化合物的 log LD_{50}（家蝇）与 pI_{50} 之间大致有直线关系，但在 log LD_{50}（小白鼠）与 log CO_2 微升之间就沒有明显的关系。

3. 选择毒性与昆虫体内和动物体内的酶系有关，因此更为复杂。化合物的结构与选择毒性之间也沒有明显关系。化合物中仅有异丙酯基选择毒性最強，甲酯基次之，而苯酯基和硫代乙酯基完全沒有选择毒性。

参　考　文　献

刘 珣、娄照祥、梅雪琴 1964。选择性有机磷杀虫剂 O, O-二烷基 S-烷基酯基烷基二硫代磷酸酯的合成。化学学报 **30**: 432。

蒋明谦、戴萃辰 1962。分子结构与化学活性间的定量关系 I. 非共轭体系中的誘导效应。化学学报 **28**: 275。

Aldridge, W. N. 1953. The inhibition of erythrocyte cholinesterase by triesters of phosphoric acid. *Biochem. J.* **54**:442.

Aldridge, W. N. & A. N. Davison. 1953. The mechanism of inhibition of cholinesterase by organophosphorus compounds. *Biochem. J.* **55**:763.

Barnard, M. L. & K. J. Laidler. 1952. Solvent effects in the α-chymotrypsin-hydrocinnamic ester system. *J. Amer. Chem. Soc.* **74**:6099.

Dauterman, W. C. & F. Matsumura. 1962. Effect of malation analogs upon resistant and susceptible *Culex tarsalis* mosquitoes. *Science* **138**:694.

Davison, A. N. 1955. Return of cholinesterase activity in the rat after inhibition by organophosphorus compounds. *Biochem. J.* **60**:339.

Ingold, C. K. 1953 "Structure and mechanism in organic chemistry." p. 758, 777, Cornell University.

Krueger, H. R. & R. D. O'Brien. 1959. Relationship between metabolism and differential toxicity of malathion in insects and mice. *J. econ. Ent.* **52**:1063.

March, R. B. et al. 1956. Fate of P^{32}-labelled malathion in the lying hen, white mouse and American cockroach. *J. econ. Ent.* **49**:185.

Matsumura, F. & A. W. A. Brown. 1961. Biochemistry of Malathion resistance in *Culex tarsalis. J. econ. Ent.* **54**:1176.

———— 1963. Studies on carboxyesterase in malathion resistant *Culex tarsalis. J. econ. Ent.* **56**:381.

Matsumura, F. & W. C. Dauterman. 1964. Effect of malathion analogues on a malathion-resistance housefly strain which possesses a detoxification enzyme carboxyesterase. *Nature.* **202** (4939) 1356.

Metcalf, R. L. & R. B. March. 1949. Studies of the mode of action of parathion and its derivatives and their toxicity to insects. *J. econ. Ent.* **42**:721.

Metcalf, R. L. 1955. "Organic Insecticides". p. 289 Interscience Publishers, Inc. New York.

O'Brien, R. D. 1957. Properties and metabolism in the cockroach and mouse of malathion and malaoxon. *J. econ. Ent.* **50**:159.

O'Brien, R. D. et al. 1958. New organophosphate insecticides developed on rational principles. *J. econ. Ent.* **51**:714.

STUDIES ON SELECTIVE ORGANOPHOSPHORUS INSECTICIDES: CHEMICAL STRUCTURE AND BIOLOGICAL ACTIVITY OF ACETHION ANALOGS

LIU HSUEN, LENG HSIN-FU & YANG PAN-NUNG
(*Institute of Zoology, Academia Sinica*)

A series of O,O-dialkyl S-carboalkoxyalkyl phosphorodithioates were examined for hydrolysis rates by mouse liver enzyme, anticholinesterase activities to house fly cholinesterase and toxicities to house flies (*Musca domestica vicina* Macq.) and mice. Linear relationships between the logarithm of hydrolysis rate, and also pI_{50}, and inductive effect index (I) of the alkyl radical in the carboalkoxy group were observed. A rough linear relationship between $\log LD_{50}$ (house fly) and pI_{50} was also observed with some deviations which are presumably due to the fact that several compounds are more easily activated in vivo. There is no correlation between mouse liver hydrolysis rate and toxicity to mice, and the evidence indicates that carboxyesterase hydrolysis is not the only factor of the detoxification of these compounds, in which phosphotase hydrolysis may be involved. Most of compounds listed in table 3 showed selective toxicity. Among these, AP_4 is the best with a selective ratio (LD_{50} mouse/LD_{50} house fly) of 221.